

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **60-161999**

(43)Date of publication of application : **23.08.1985**

(51)Int.Cl.

C07K 7/08

A61K 37/02

A61K 39/29

C07K 7/10

(21)Application number : **59-019126**

(71)Applicant : **CHEMO SERO THERAPEUT RES  
INST  
FUJISAWA PHARMACEUT CO  
LTD**

(22)Date of filing : **02.02.1984**

(72)Inventor : **MIAKE FUMIO  
MIYANOHARA KOJI  
OTOMO SHINYA  
MATSUBARA KENICHI  
HASHIMOTO SHINJI  
HENMI KEIJI  
HAGIWARA DAIJIRO**

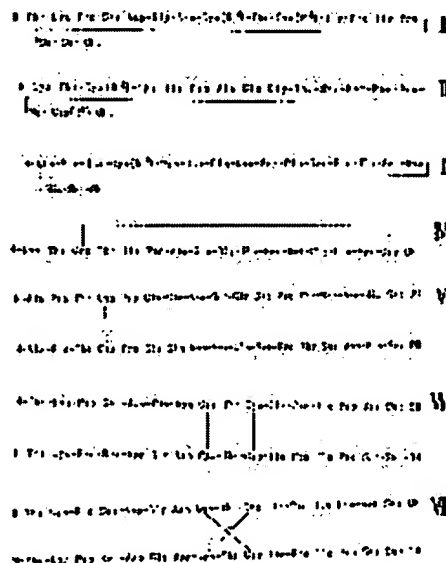
## (54) PEPTIDE

### (57)Abstract:

NEW MATERIAL: A compound (salt) expressed by formulas I WVII (R4 is H or protecting group of mercapto).

USE: An antigen for analyzing hepatitis B viruses and antigen for hepatitis B vaccines.

PREPARATION: For example, serine having amino group protected with tert- butoxycarbonyl group is linked to a chloromethylated styrene-divinylbenzene copolymer resin as a carrier to give N-tert-butoxycarbonyl-O-benzylserine resin. The amino group of the resultant resin is then eliminated, and amino acids having protected amino groups are condensed with the resin according to the amino acid sequence of the aimed peptide in the presence of a condensing agent. The operation to eliminate protecting groups is repeated successively to afford a peptide resin, which is then treated with hydrogen fluoride in the presence of a solvent to separate the peptide from the carrier and give the aimed peptide expressed by formulas I WVII.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of

rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁 (J P)      ⑪ 特許出願  
 ⑫ 公開特許公報 (A)      昭60-16

⑬ Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	序内整理番号	⑭ 公開 昭和60年(1986
C 07 K 7/08		6464-4H	
A 61 K 37/02		7138-4C	
		7043-4C	
C 07 K 7/10		6464-4H	審査請求 未請求 発明の数 1

⑮ 発明の名称      ペプチド

⑯ 特 願 昭59-19126

⑰ 出 願 昭59(1984)2月2日

⑱ 発 明 者	見 明 史 雄	熊本市清水町櫛木1369-4
⑱ 発 明 者	宮 之 原 厚 司	寝屋川市郡元町8-16
⑱ 発 明 者	大 友 信 也	熊本市島崎6-22-29
⑱ 発 明 者	松 原 謙 一	大阪市福島区福島3-1-57-909
⑱ 発 明 者	橋 本 真 志	宝塚市中山五月台1-6-17
⑱ 発 明 者	遠 見 恵 次	吹田市青葉丘南8 (S-501)
⑱ 発 明 者	萩 原 大 二 郎	守口市金田町2-110-4
⑲ 出 願 人	財団法人化学及血清膜 法研究所	熊本市清水町大窪888
⑲ 出 願 人	藤沢薬品工業株式会社	大阪市東区道修町4丁目3番地
⑳ 代 理 人	弁護士 植 木 久 一	

明 細 書

1. 発 明 の 名 称

ペプチド

2. 特 許 請求 の 範 囲

H-Thr-Lys-Pro-Ser-Asp-Gly-Asn-Cys(R<sup>4</sup>)-Thr-Cys(R<sup>4</sup>)-Ile-Pro-Tle-Pro  
 Ser-Ser-OH,

H-Lys-Thr-Cys(R<sup>4</sup>)-Thr-Ile-Pro-Gln-Gln-Thr-Ser-Met-Phe-Pro  
 Ser-Cys(R<sup>4</sup>)-OH,

H-Ala-Pro-Thr-Cys(R<sup>4</sup>)-Pro-Gly-Gln-Asn-Ser-Gln-Ser-Pro-Thr-Ser-Asn  
 His-Ser-OH,

H-Lys-Thr-Cys-Thr-Ile-Pro-Ala-Gln-Gln-Thr-Ser-Met-Phe-Phe-Ser-Cys-OH

H-Ala-Pro-Thr-Cys-Pro-Gly-Gln-Asn-Ser-Gln-Ser-Pro-Thr-Ser-Asn-His-Ser-OH

H-Thr-Lys-Pro-Ser-Asp-Gly-Asn-Cys-Thr-Cys-Ile-Pro

H-Thr-Lys-Pro-Ser-Asp-Gly-Asn-Cys-Thr-Cys-Ile-Pro

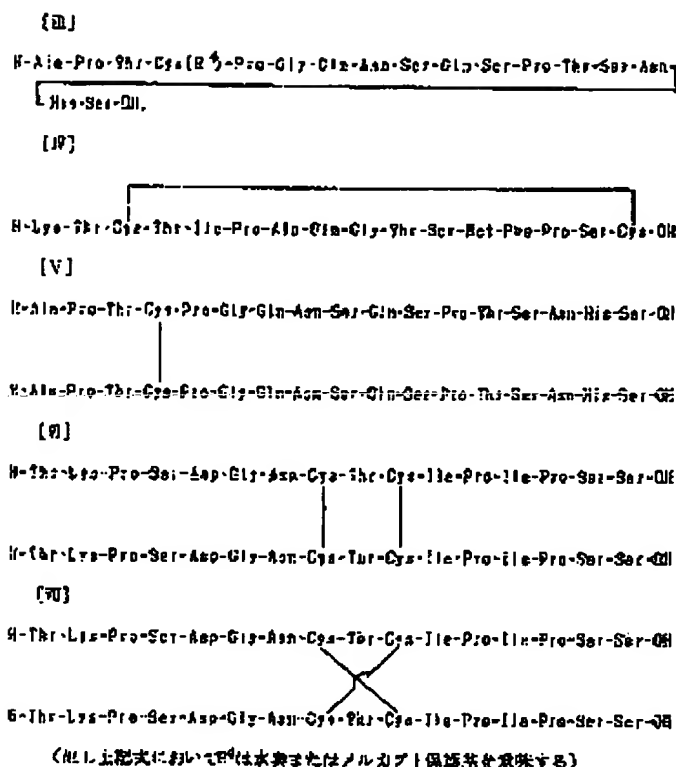
（但し上記各式においてR<sup>4</sup>は本素またはメルカプト基  
 から置換されるペプチド又は配位とし  
 るそれらの基、

3. 発 明 の 詳 細 な 説 明

この発明は新規なペプチドに関する。  
 詳細にはB型肝炎ウイルス抗原の原核に  
 まはB型肝炎ワクチン用抗原組成物等と  
 な新規ペプチドおよび医薬として許容さ  
 れるものである。

この発明の新規ペプチドは、次の

73期



この明細書においてはアミノ基、格連等について、IUPAC-IUB on Biological Nomenclatureが当該分野における慣用語であり、それらを併示すると次の通りである。Cys:システイン、I:Pro:プロリン、Ile:イソロイシン、Gln:グルタミン酸、Asn:アスパラギン、Ala:アラニン、Gln:グルタミン酸、Gly:グリシン、Lys:リジン、Ser:セリン、Boc:tert-butyl:tert-butyl、2:クロロベンジル、Cal:ベンジル、Ac:アセト、P:トリエンシルホニル、O:CH:ルエステル。

この発明の化合物 [I] ~ [X] として併示されるそれらの値は、無効とすることができ、以下に示す。

(1) 方法 1 (樹形法による):

# 1) 方法 1 - 1

$\text{R}^1\text{-Ser(R}^2\text{)-樹形 [I a] } \rightarrow$

$\text{R}^1\text{-Thr(R}^0\text{)-Lys(R}^1\text{)-Pro-Ser(R}^2\text{)-Asp}$

$\text{[OH}^2\text{)-Gly-Asp-Cys(R}^4\text{)-Thr(R}^3\text{)-Cys}$

$\text{[R}^4\text{)-Ile-Pro-Ile-Pro-Ser(R}^5\text{)-Ser}$

$\text{[R}^5\text{)-樹形 [I b]}$

# 2) 方法 1 - 2

$\text{R}^1\text{-Cys(R}^4\text{)-樹形 [II a] } \rightarrow$

$\text{R}^1\text{-Lys(R}^1\text{)-Thr(R}^2\text{)-Cys(R}^4\text{)-Thr(R}^3\text{)-}$

$\text{Ile-Pro-Ala-Gln-Gly-Thr(R}^5\text{)-Ser(R}^6\text{)-}$

$\text{Met-Phe-Pro-Ser(R}^7\text{)-Cys(R}^4\text{)-樹形 [II b]}$

[II b]

$\text{R}^1\text{-Thr(R}^2\text{)-Lys(R}^1\text{)-Pro-Ser(R}^3\text{)-A}$

$\text{[OH}^2\text{)-Gly-Asn-Cys(R}^4\text{)-Thr(R}^5\text{)-C}$

$\text{[R}^4\text{)-Ile-Pro-Ile-Pro-Ser(R}^6\text{)-Se}$

$\text{[R}^6\text{)-樹形 [I b] } \rightarrow$

$\text{H-Thr-Lys-Pro-Ser-Asp-Gly-Asn-Cy}$

$\text{[R}^4\text{)-Thr-Cys(R}^4\text{)-Ile-Pro-Ile}$

$\text{[Pro-Ser-Ser-OH [I c]}$

# 2) 方法 2 - 2

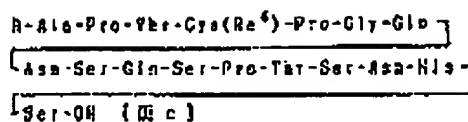
$\text{R}^1\text{-Lys(R}^1\text{)-Thr(R}^2\text{)-Cys(R}^4\text{)-Tr}$

$\text{Ile-Pro-Ala-Gln-Gly-Thr(R}^5\text{)-Se}$

$\text{Met-Phe-Pro-Ser(R}^7\text{)-Cys(R}^4\text{)-}$

[II b]

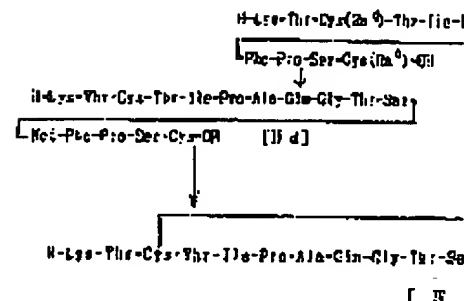
特開昭6



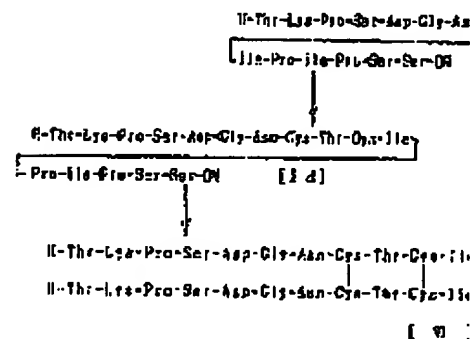
(以下全)

(3) 方法 3 (メルカプト保護基の脱離および鎖)

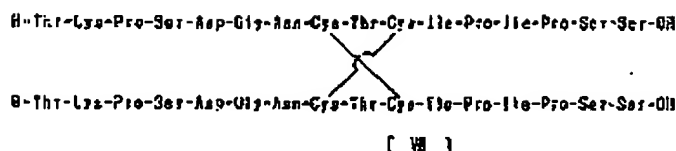
1) 方法 3 - 1



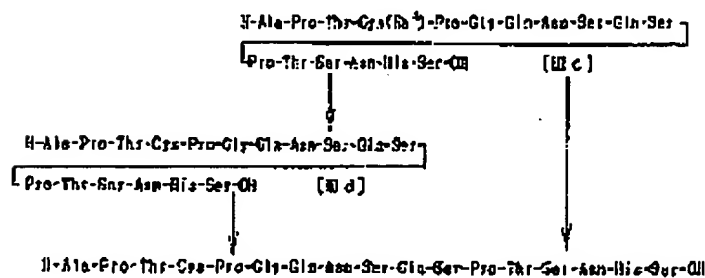
2) 方法 3 - 2



形式 (他法)



3) 方法 3 - 3



上記式中、 $R^1$ はアミノ保護基、 $R^2$ はカ  
保護基、 $R^3$ はドルキン保護基、 $R^4$ は  
ト保護基をそれぞれ意味する。これらの  
いて説明すれば下記の通りである。

(1)  $R^1$ におけるアミノ保護基について  
アミノ保護基には、アミノ酸やペプチ  
分野において汎用される通常のアミノ保  
まれ、そのようなアミノ保護基の好まし  
ては、アルコキシカルボニルまたはシク  
キシカルボニル（例えばトキシル、  
トキシカルボニル、シクロ  
カルボニル等）、遊離または非遊離のフ

## 特開明60-11

の分野において汎用される通常のカルボキシ保護基が含まれ、そのような保護基の好ましい例としては、例えば低級アルキル（例えばメチル、エチル等）等のアルキル、シクロアルキル（例えばシクロペンチル、シクロヘキシル等）、モノー又はジフェニル低級アルキル（例えばベンジル、ジフェニルメチル等）等のアラルキル、アロイルアルキル（例えばフェナシル、トルオイルニル等）等が挙げられる。

(3) R<sup>2</sup>におけるヒドロキシ保護基について：

ヒドロキシ保護基にはアミノ酸やペプチド化学の分野において汎用される通常のヒドロキシ保護基が含まれ、そのようなヒドロキシ保護基の好ましい例としては、例えばアルカノイル（例えばアセチル等）等のアシル、置換または非置換のアラルキル（例えばベンジル、2,6-ジクロロベンジル等）等が挙げられる。

(4) R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>におけるメルカプト保護基について：

メルカプト保護基の好ましい例としては、カル

ボキシ保護基、アミノ保護基およびヒドロキシ保護基の脱離条件下では脱離しない保護基、そのような保護基の好ましい例としてシラミノアルキル（例えばアセチル、ベンズアミドメチル等）、アリータン（例えば3-ニトロピリジノー2等）等が挙げられる。また、置換または非置換アルキル（例えばヒープチル等）、置換アラルキル（例えばベンジル、p-ベンジル、p-メチルベンジル、3-ベンジル、ジフェニルベンジル、等）、置換または非置換の低級アルキル（例えばエチルメルカプト、ヒープチル等）等もも保護基の脱離条件を適ることにより使用することができる。として許容される点について：化合物【甲】における尿素として許容されるのはアルカリ金属塩（例えばナトリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（例えばアンモニウム塩、有機アミン

エタノールアミン塩、トリエチルアミン塩、シクロヘキシルアミン塩等）等の無機塩基若しくは有機塩基との塩及びトリフルオロ酢酸、メタンスルホン酸、塩酸、硫酸、硝酸、炭酸等の有機酸又は無機酸の付加塩が含まれる。上記各種方法について以下に説明する。(1) 方法1について：

この方法は、化合物【I a】および【II a】に、固相法によるペプチド合成の常法に従って、各保護された側鎖アミノ酸を順次カップリングさせて、化合物【I b】、【II b】および【III b】を得る方法である。

ここで出発物質として使用する化合物【I a】

共重合体、ヒドロキシメチル化ポリビニルベンゼン共重合体、アミド化されたスチレン-ジビニルベンゼン共重合体、ポリスチレン樹脂、ポリビニルアミド樹脂のようなポリアミド型樹脂を得る。

この方法は一般には各保護された構造の基々につき、次のような1〜10のサイクルとして行われる。

## 1) 工程1：

この工程は出発物質である保護された側鎖-樹脂を、洗浄し、また樹脂を脱

## 特開昭60-1619

の様な脱脂のより行われる。

上記脱脂方法の中では、薬を用いる方法が最も適用されるので以下脱脂法について説明する。

この反応は塩化メチレン、クロロホルム、酢酸、水等の溶媒中において、トリフルオロ酢酸、酢酸、フェートルエンスルホン酸、塩酸、炭酸等の無機酸又は有機酸の存在下に、好ましくはエタレンジオールやアニソールを添加して行われる。

上記例示の酸のうち、トリフルオロ酢酸及び炭酸は溶媒としても使用される。

この反応は通常、冷却（例えば-78℃）乃至室温下に行なわれる。

## 3) 工程 3 :

この工程は不純物の除去および樹脂の脱脂のために行う工程であり、前記工程 1 と実質的に同様な方法により行われる。

## 4) 工程 4 :

この工程は樹脂を乾燥させて洗淨効果をあげるために行われる工程であり、アミノ酸-樹脂

をアルコール（メタノール、エタノール、プロパノール、2-プロパノール、ブタノール）、ジオキサン等で処理するのが好ましい。

## 5) 工程 5 :

この工程は不純物の除去および樹脂の脱脂のために行う工程であり、前記工程 1 と実質的に同様な方法により行う。

## 6) 工程 6 :

この工程は前記の工程 1 ~ 5 の処理にされるアミノ酸-樹脂に於けるアミノ基における置換基として存在する、脱脂のために行われる工程であり、トリエチルアミンのような塩基で処理することにより行われる。

## 7) 工程 7 :

この工程は不純物の除去および樹脂の脱脂のために行う工程であり、前記工程 1 と実質的に同様な方法により行う。

## 8) 工程 8 :

この工程は乾燥された構成アミノ酸-

プリングさせる工程であり、ジシクロヘキシルカルボジイミドのような常用の縮合剤の存在下塩化メチレン、クロロホルム、ジメチルホルムアミドのような溶媒中で行うこともでき、また乾燥された構成アミノ酸のカルボキシ基を、常法により酸酐水物、活性エステル等に活性化して、上記溶媒中で反応を行うこともできる。

## 9) 工程 9 :

この工程は不純物の除去および樹脂の脱脂のために行う工程であり、前記工程 1 と実質的に同様な方法により行う。

## 10) 工程 10 :

各工程（ただし工程 8 を除く）は 2 ~ 3 くり返し行うのが好ましい。

## (2) 方法 2 について :

この方法は化合物 [I b]、[II b]、[III b] をそれぞれアミノ保護基、カルボキシ基およびヒドロキシ保護基の脱離手段で、それぞれ化合物 [I c]、[II c]、[III c] を得る方法である。

アミノ保護基を脱離する方法は、前記 (1) の工程 2 と実質的に同様な方法か、還元法、液体アンモニア-アルカリ金属法、脱炭酸、ヒドラジン法等により行なわれ、

## 特開昭60-16

ンスルホン酸、リートルニンスルホン酸等)、  
酸性イオン交換樹脂等が挙げられる。

又好適な塩基としては、アルカリ若しくはアルカリ土類金属の水塩化物、炭酸塩若しくは重炭酸塩(例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸リチウム、炭酸水素ナトリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等)、水酸化アンモニウム等の無機塩基等が挙げられる。

加水分解は冷却若しくは加温の様な比較的緩やかな条件で且つ反応に膨脹を及ぼさない溶媒(例えば水、アルコール(例えばメタノール、エタノール、プロパノール等)の様な親水性溶媒、アセトン、N、N-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジメチルスルホキシド等またはこれらの混合溶媒)中において行われる。

## 2) 還元:

化学還元及び接触還元法を含む還元方法は常法により行なわれる。

好ましい溶媒としては、例えば水、アルコール(例えばメタノール、エタノール、プロパノール等)、酢酸及び他の一般的有機溶媒若しくはその混合物が用いられる。又、化学的還元において使われた前述の溶媒も又溶媒として兼用できる。更に接触還元を用いられる好ましい溶媒としては、上述のもの以外に、ジエチルエーテル、ジオキサン、テトラヒドロフラン等若しくはその混合物も使用される。

反応は冷却若しくは加温等の比較的 やかな条件下に速やかに行われる。

アミノ保護基、カルボキシル保護基およびヒド

化学還元を使用される好ましい還元は、例えば金属(例えば銅、亜鉛、鉄、金、銀化合物(例えば塩化クロム、酢酸等)と有機若しくは無機酸(例えば硝酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸、ルエンスルホン酸、塩酸、臭化水素酸)の組合わせ等が挙げられる。

又接触還元を使用される好ましい還元は、白金触媒(例えば白金板、白金、白金黒、白金コロイド、酸化白金等)、パラジウム触媒(パラジウム、パラジウム黒、酸化パラジウム、ム炭素、パラジウムコロイド、パラジ酸バリウム、パラジウム-炭素等)、ニッケル触媒(還元ニッケル、ケル、ラネーニッケル等)、コバルト(例えば還元コバルト、ラネーコバルト等)触媒(例えば還元鉄、ラネー鉄等)、若しくは還元銅、ラネー銅、ウルマン銅等と示される。還元は通常溶媒中で行なわ

この方法はメチオニン、アニソール下反応を行うと好結果が得られる場合また上記触媒は溶媒としても使用され反応は通常冷却〜0℃付近で行うのが

## (3) 方法3について:

この方法は、化合物【I c】、【II c】及び【III c】をメルカプト保護基の脱離して対応するメルカプト保護基の脱離物ならびに分子内のS-S結合および分子間のS-S結合を形成した化合物【I d】、【II d】、【III d】、【IV】、【V】、【VI】



特開昭60-161991

方法：

1)-1 (化合物 [I c] → 化合物 [I d]、化合物 [II c] → 化合物 [II d]、化合物 [III c] → 化合物 [III d])：

この方法は、化合物 [I c]、[II c] または [III c] を酢酸水銀、トリフルオロ酢酸水銀、酢酸銀等の金属塩、トリフェニルホスフィン、トリブチルホスフィン等の有機りん化合物、メルカプトエタノール、メルカプト酢酸、エタングチオール、チオフェノール、ジチオスライトール、ジチオエリスリトール等のアルキルまたはアリールチオール等の試薬で処理することによって、それぞれ対応する化合物 [I d]、化合物 [II d] または化合物 [III d] を得る方法である。

この反応は通常溶媒中で行われ、好ましい溶媒としては例えば水、アルコール（例えばメタノール、エタノール、プロパノール等）、ジオキササン、ジメチルホルムアミド並びにこれらの混合溶媒等が挙げられる。

または [III c]、化合物 [II c] → 化合物 [IV]、化合物 [III c] → 化合物 [V])：

この方法は化合物 [I c]、化合物 [II c] または化合物 [III c] をよう素、ジチオサイアノーゲン等の求電子試薬で処理することによって化合物 [I c] に対応して化合物 [IV] および（または）化合物 [III] を、化合物 [II c] に対応して化合物 [IV] を、化合物 [III c] に対応して化合物 [V] をそれぞれ直接得る方法である。

この反応は通常溶媒中で行われ、好ましい溶媒の例としては、水、アルコール（例え

この反応は溶媒～加温程度の比較的穏やかな条件下で速やかに行われる。

1)-2 (化合物 [I d] → 化合物 [IV] および（または）化合物 [III]、化合物 [II d] → 化合物 [IV]、化合物 [III d] → 化合物 [V])：

この方法は化合物 [I d]、化合物 [II d] または化合物 [III d] を比較穏やかな酸化条件下で処理することによって化合物 [I d] に対応して化合物 [IV] および（または）化合物 [III] を、化合物 [II d] に対応して化合物 [IV] を、化合物 [III d] に対応して化合物 [V] をそれぞれ得る方法である。

ここで使用される酸化剤の好ましい例としては例えば空気中の酸素、フェリシアンリウム等が挙げられる。

2) 塩基性メルカプト基を有する化合物を結晶化する方法：

(化合物 [I c] → 化合物 [IV] および

まれる。

この発明のペプチド、すなわち化合物 [IV] および医薬として許容されるそれ前記のようにB型肝炎ウイルス抗原の解であり、またB型肝炎ワクチン用抗原としても有用であり、さらにまたこれらの癌細胞増殖性をも有し、抗癌剤として用いられる。

以下この発明のペプチド [I] ～ [IV] で、感受性試験を示す試験例を示す。

試験例（癌細胞増殖に対する抑制効果）(1) 方法：

特開昭60-16

22 (濃度:  $2.0 \times 10^3$  cfu/ml)  
を滅菌生理食塩水にけん濁し、  
これを0.2 ml腹腔内感染させ  
た。感染後4日間マウスの生死  
を観察し、その生存率(%)を  
求めた。

(ロ) 結果:

この発明のペプチド (実施例番号で示す)	投与量 (mg/kg)	生存率 (%)
実施例3~(2)	1.0	90
	0.1	80
	0.01	70
	0	20
実施例4	1.0	50
	0.1	30
	0.01	40
	0	20

この発明の医薬組成物は、たとえば固  
体または液体形態の製剤の形態で使用す  
る。この製剤はこの発明の有効成分を、外科  
または非経口投与に適した有機または無機  
は賦形剤と混和した状態で含有している。  
分は、たとえば錠剤、ペレット剤、カプ  
セル剤、溶液剤、乳化剤、懸濁液その他  
の任意の剤形の慣用の無害な賦形剤  
と配合することができる。使用し  
得る、グルコース、乳糖、アラビノゴ  
ス、マンニト、スターチペースト、  
ムトキシリケート、タルク、コーンステ  
ラチン、酸態(コロイド状)シリカ、  
デンプン、炭素およびその他の固体、  
は液体形態の製剤を製造するのに適し  
る。固体のほかに、補助剤、安定化剤、  
および着色剤、あるいは香料などを使用し、  
医薬組成物はまたは有効成分の塩性を  
増強して防腐剤または防腐剤を含有しても、  
成分の化合物は、塩酸塩または酢酸塩に

効果を生ずる様に十分な量で医薬組成物中に存  
在させる。

この組成物を人に投与する場合、経口内、筋肉  
内または経口投与により投与するのが好ましい。  
この発明の有効化合物の投与量または治療効果  
は化合物の種類ならびに治療を受ける患者の年  
令および状態によって異なるが、一般に人または  
動物の体重1kg当り1日に約0.1~1000mgの有効  
成分を治療目的に投与する。また1回の平均投与  
量としては約50mg、100mg、250mgおよび  
500mgが用いられる。

次にこの発明の実施例を示すが、各実施例にお

Pro, Ile, Cys, Thr, Cys, Asn, Glu, Asp, Ser,  
Thrであり、表のスケジュールを15日  
繰り返すことにより16個のアミノ酸残  
ペプチドを合成した。なお、これらの  
α-アミノ基はN-ブトキシカルボニ  
ルの側鎖官能基については、Ser, Thr  
ル基で、Cys はアセチアミドメチル基、  
シクロヘキシルエステルで、Lys は2-  
シクロオキシカルボニル基でそれぞれ  
いた。

(以下)



時間時60-10

表

工程	試 薬 又 は 溶 液	時 間
1	塩化メチレン	3 分 × 3
2	塩化メチレンとトリフルオロ酢酸の 1 : 1 混合液	3 0 分 × 1
3	塩化メチレン	3 分 × 3
4	2-プロパノール	3 分 × 2
5	塩化メチレン	3 分 × 3
6	塩化メチレンとトリエチルアミンの 1 0 : 1 混合液	3 分 × 2
7	塩化メチレン	3 分 × 3
8	保護されたアミノ酸 (3 当量) ジシクロヘキシルカルボジイミド (同)	3 ~ 5 時間
9	塩化メチレン	3 分 × 5
10	2-プロパノール	3 分 × 3
11	ジメチルホルムアミド	3 分 × 3

オロ酢酸混合液中に5重量%のエタンジチオールを添加した行なった。又翌にAsp をカップリング反応させた後第12番目以降のアミノ酸を導入するに当っては第8工程の中和は、トリエチルアミンの氷浴溶液を用いて行ない、且つ処理時間も1.5分に短縮した。

各カップリング反応が完成されたか否かの検査は、カイザーのエンヒドリンテストによった。そしてカップリングが不十分であることが検知されたときは、表における第8, 9, 10, 11及び1の各工程を、この配義順に従って繰り返した。実験では、Cys (第6番目)、Gln, Asp, Ser のカ

卸ち図の第1~11工程に示す手順  
 熟原料 (又は出発原料のN-末端アミノ酸をカップリングさせることによって、  
 を延長させていって得られる中間物質の  
 の溶媒及び試薬を順次作用させること、  
 プチド鎖を延長していった。尚同手順、  
 工程にあるカップリング反応) は一般に  
 メチレン溶液中で行なったが、S-アセ  
 チル基で保護されたCys を反応させ  
 は、塩化メチレンとジメチルホルム  
 (2 : 1) 混合液を用いた。また、Asp  
 リング反応に於てはN-ε-プトキシカル  
 スパラギンをN-ヒドロキシベンゾト  
 (1:1当量) とジシクロヘキシルカルボ  
 (1当量) のジメチルホルムアミド  
 (1 : 1) 混合液に加え、0℃で1  
 することによって活性化した上で第8  
 した。第7番目以降のアミノ酸を導入  
 を用いる第1番目の反応の終了後) に  
 表に示した第2工程は、塩化メチレン

-Ile-Pro-Ile-Pro-Ser(821)-Ser(821)  
 実施例) - 2

上記で得たペプチド樹脂 (1-1)  
 アニソール (4.0g) の存在下ふっ  
 91) 中、-6~-5℃で1時間攪拌し  
 同温度で2時間、および室温で1時間  
 化水層を減圧留去した。残留物に  
 (100%) とエーテル (50%) を加え、5  
 時間攪拌した。樹脂状物を留去して1  
 移した。油液、洗液を合し、エーテル  
 水層をダウエックス1×2 (酢酸型、1  
 のカラムに通し、吸着乾燥すると粗

## 特開60-16

し、240～284mlの分画を集めて凍結乾燥すると、結晶品(447mg)が得られた。次の分画(285～312ml)からは、やや結晶度は落ちるが、結晶品と見なし得るもの(485mg)が得られた。

上記の結晶品(438g)をセファデックスG-15(3.2×60cm: 1%酢酸で平衡化したもの)のカラムに道し、脱塩を行った。1%酢酸で脱出し、144～208mlの分画を集めて凍結乾燥すると、炭水化物の脱塩物質(1-2: 388g)が得られた。

(1) 酸による加水分解物(6N塩酸で110℃

で、24時間の処理物)のアミノ酸分析:

Thr: 0.82×2      Lys: 1.00  
Pro: 1.07×3      Asp: 1.08×2  
Gly: 1.13      Ile: 1.01×2  
Ser: 1.02×3

(2) 薄層クロマトグラフィ R<sub>f</sub> = 0.40

[セルロース・メルクNo. 5552、n-ブタノール-酢酸-水=ピリジン(15:3:32:10)ニシドリンにより検出]

レン溶液中で進行した。グルタミンのカップリングは実施例1-1のアスパラギンカップリングに倣った。尚カップリングが不十分なため第8,9,10,11及び1工程の繰り返しを必要としたのは、第1番目のSer及び第10番目のProをカップリング反応させたときであった。一番最後、Lysをカップリングし終えた段階で、得られた樹脂状物を実施例1-1と同様に処理したところ、次式で示されるペプチド樹脂(2-1)(9.32g)が得られた。

Boc-Lys(Cl-2)-Thr(Bzl)-Cys(Ac)-Thr(Bzl)-Ile-Pro-Ala-Gln-Gly-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Met-

(3) 高速液体クロマトグラフィ

保持時間: 5.0分

カラム: ヌグレオジル5018(150:

脱出液: pH4.8の0.1M酢酸-塩

ウム緩衝液とアセトニ

94:1の混合液

流速: 1.0ml/分

検出: UV210nm

実施例2-1

N-1-ブトキシカルボニル-S-ジメチルシスチン樹脂(4.02g: シスチン: 0.45gモル/g)を出発原料とし、-1に準じてペプチド結合形成反応を催しアミノ酸の反応順序は、Ser, Pro, Ser, Thr, Gly, Gln, Ala, Pro, Ile, Val, Cysであった。次の第2工程に用いた混合液は、5重量%のエタジオールを含む。又第8工程のカップリング反応、S-アセトアミドGlyの反応にあっては、5%のジメチルホルムアミドを含む。

化メチレン(3分×3)で順次洗浄し、樹脂をメタノールで洗浄した後、減圧下で乾燥した。上記処理により保護基が脱したものを、アニソール(4.5ml)と共に1-2と同様にふた化水素(4.5ml)中、同様に処理した。尚塩酸で1時間40分炭水化物を脱圧除去し、脱出液に1M酢酸(エーテル(10ml)を加えた。以下実施例1-1に準じて凍結乾燥すると、樹脂のH-Lys(Ac)-Thr-Ile-Pro-Ala-Gln-Gly-Thr-Phe-Pro-Ser-Cys(Ac)-OH(1.028g)が得られた。この結晶品(100mg)をカルボキシメチル

## 特開昭60-16

し、240～284mlの分画を集めて凍結乾燥すると、結製品(417mg)が得られた。次の分画(285～312ml)からは、やや結製品は落ちるが、結製品と見なし得るとの(405mg)が得られた。

上記の結製品(43mg)をセファデックスG-15(3.2×60cm:1%酢酸で平衡化したもの)のカラムに通し、脱塩を行った。1%酢酸で溶出し、144～208mlの分画を集めて凍結乾燥すると、脱塩された目的物質(1-2:38mg)が得られた。

(1) 酸による加水分解物(6N塩酸で110℃、24時間の処理物)のアミノ酸分析:

Thr:0.32×2      Lys:1.00  
Pro:1.07×3      Asp:1.08×2  
Gly:1.13      Ile:1.01×2  
Ser:1.02×3

(2) 薄層クロマトグラフィ Rf=0.40

[セルロース・メルクNo. 9552、N-ブチノール・酢酸・水・ピリジン(15:3:32:10)ニヒドリソにより検出]

レン溶液中で遂行した。グルタミンのカップリングは実施例1-1のアスパラギンカップリングに倣った。尚カップリングが不十分なため第8,9,10,11及び11工程の繰り返しを必要としたのは、第1番目のSer及び第10番目のProをカップリング反応させたときであった。一層最後のLysをカップリングし終えた段階で、得られた樹脂状物を実施例1-1と同様に処理したところ、次で示されるペプチド樹脂(2-1)(9.32g)が得られた。

Boc-Lys(CI-H)-Thr(Bzl)-Cys(Ac)-Thr(Bzl)-Ile-Pro-Ala-Gln-Gly-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Met-

(5) 高速液体クロマトグラフィ

保持時間:3.0分

カラム:ヌクレオジル50μg(150:

溶出液:pH4.8の0.1M酢酸-塩

ウム緩衝液とアセトニ

94:1の混合液

流速:1.0ml/分

検出:UV210nm

実施例2-1

N-1-ブチキシルホルニル-S-ジメチルシスチン樹脂(4.02g:シス量:0.48mmol/g)を山元原料とし、-1に準じてペプチド結合形成反応を、但しアミノ酸の反応順序は、Ser,Pro,Ser,Thr,Gly,Gln,Ala,Pro,Ile,Bzl,Cysであった。該の第2工程に用いた溶媒は、5重量%のエタノールを含む。同いた。又第8工程のカップリング反、S-アセトアミドGlyの反応にあって、最期のジメチルホルムアミドを含む

化メチレン(3分×3)で順次洗浄し、樹脂をメタノールで洗浄した後、減圧下乾燥した。上記処理により保護基が除去したものを、アニソール(4.5ml)と共に1-2と同様にふっ化水素(45ml)中、同様に攪拌した。尚塩酸で1時間40分後、水素を減圧除去し、残留物に1M酢酸(エーテル(40ml)を加えた。以下実施例1-1に準じて凍結乾燥すると、粗製品の8-Lys(Ac)-Thr-Ile-Pro-Ala-Gln-Gly-Thr-Phe-Pro-Ser-Cys(Ac)-OH(1.028g)が得られた。この粗製品(100mg)をカルボキシメチル

時間 60

た。144~168 mlの分画を集めて凍結乾燥すると、精製された目的物質(2-2: 24.9 mg)が得られた。

(1)酸による加水分解物(6 N塩酸で110℃、

24時間の処理物)のアミノ酸分析:

Thr: 0.82×3      Lys: 1.00

Pro: 1.12×2      Ala: 1.19

Gly: 1.02      Ile: 0.98

Glu: 1.16      Met: 1.04

Ser: 0.92×2      Phe: 1.00

(2)薄層クロマトグラフィ R<sub>f</sub> = 0.59

[セルロース・マルチセ 8852、 $\alpha$ -ブチノール酢酸-水-ピリジン(15:5:12:10)エシドリンによる検出]

(3)高温液体クロマトグラフィ

保持時間: 4.8分

カラム: スープレオゲル 10C<sub>18</sub> (250×4mm)

溶出液: pH 4.8の0.1 M酢酸-酢酸銅ニカリウム緩衝液とアセトニトリルの81:19混合液

流速: 1.5 ml/分

検出: UV 210 nm

(4)元素分析: C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub> · 9H<sub>2</sub>O  
C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub> · 9H<sub>2</sub>O

計算値 C 46.16 H 8.60

実験値 C 46.21 H 8.61

実施例 3-1

N- $\alpha$ -ブチノールカルバニル-O-リン樹脂(2.5 g:セリン含有量: 0.1/g)を出発原料とし、実施例1-12-1に準じてペプチド結合形成反応反応を16サイクル繰り返すことによりのアミノ酸からなるペプチドを製造し、その反応順序は、His, Asn, Ser, Thr, Gln, Ser, Asn, Gln, Gly, Pro, Cys, Thrであり、 $\alpha$ -アミノ基及び側鎖官能基を例1-1に準じた。但しHisはp-メスホルミル基で保護した。

カップリング反応が完了したか否からのエシドリンテストで調べ、第1

第4番目のThr, 第11番目のGlyを導入するカップリング反応については、第7, 8, 9, 10, 11及び12の各工程操作を繰り返して行った。最後のAlaをカップリング反応させた後で、生成物をメタノール(50 ml×8)で洗浄し乾燥すると、次式で示されるペプチド樹脂(8-1)(6.95 g)を得ることができた。

Boc-Ala-Pro-Thr(Bzl)-Cys(Acm)-Pro-Gly-Gln-Asn-Ser(Bzl)-Gln-Ser(Bzl)-Pro-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Asn-His(Tos)-Ser(Bzl)-樹脂

テスト(陽性)の分画(300 ml): 50 mlに濃縮した後凍結乾燥すると、純ペプチド1.43 g(N- $\alpha$ -ブチノール-O-ベンジルセリン樹脂から計算83.5%)が得られた。

H-Ala-Pro-Thr-Cys(Acm)-Pro-Gln-Asn-Ser-Gln-Ser-Pro-Thr-Ser-Asn-Ser-OH

本品(300 mg)を、カルボキシノ-ロース[ワットマン CH-52, 2, 8×8]酢酸-ピリジン緩衝液(pH 4.8)で

特開昭66-16

すると、精製品(182mg)が得られた。

(1) 6N塩酸による加水分解物のアミノ酸分析：

Ala: 1.0	Gly: 1.02(1)
His: 0.88(1)	Asp: 1.65(2)
Glu: 1.87(2)	Thr: 1.28(2)
Pro: 2.80(2)	Ser: 8.89(4)

(2) A P-M消化物のアミノ酸分析：

Gly: 1.0	His: 1.22(1)
Ala: 0.74(1)	Asp: 1.89(2)
Glu: 1.75(2)	Thr: 1.60(2)
Pro: 2.78(2)	Ser: 8.2(4)

(3) 薄層クロマトグラフィ R<sub>F</sub>=0.84

[セルロース、n-ブタノール(2)：酢酸

(2)：水(2)：ピリジン(1)]

(4) 高速液体クロマトグラフィ

保持時間：3.9分

カラム：RP-18 (4×250mm)

溶出液：0.1M酢酸-酢酸第二カリウム

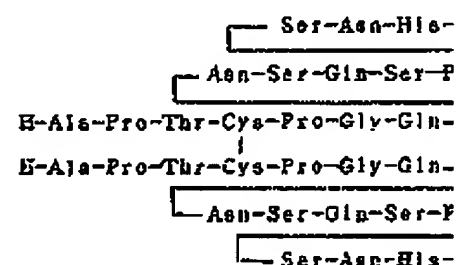
(pH2.7) (10:1.容量比)

流速：1ml/分

検出：UV210nm

実施例4

実施例3-2で得た H-Ala-Pro-Thr-  
-Pro-Gly-Gln-Asn-Ser-Gln-Ser-P  
Ser-Asn-His-Ser-OH(52mg)の80:  
8ml) 溶液により索(74.9mg)(  
ml) 溶液を加えた。反応液を室温で  
した後、0.5M酢酸ナトリウムを  
より索を分解する。この溶液を凝縮乾  
留物を1%酢酸(8ml)に溶解して  
アゲックス LH-20(8×60cm:1%酢酸  
たもの)に通し、4mlずつの分面を  
吸収(230nm)で測定した。ピーク  
面(No24~39)を集めて凝縮乾燥する



(40mg)が得られた。

(1) 6N塩酸による加水分解物のアミノ酸分析：

Gly: 1.0	His: 1.22
Ala: 0.74(1)	Asp: 1.83(2)
Glu: 1.75(2)	Thr: 1.60(2)
Pro: 2.78(2)	Ser: 8.20(4)

(2) 高速液体クロマトグラフィ

保持時間：5.2分

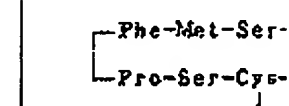
カラム：RP-18 (4×250mm)

溶出液：0.1M酢酸-酢酸第二カリウム

(pH2.7)：アセトニトリル

反応混合物を同温度で1時間攪拌し、  
トリウムの希薄水溶液を、茶色が消失  
た。反応混合物を濃縮し、残渣を  
G-15のカラム(9.2×65cm)に吸着  
酢酸で溶出した。溶出液を凝縮乾燥す  
で示されるペプチド(142mg)の粗製  
た。

H-Lys-Thr-Cys-Thr-Ile-Pro-Ala-



特開昭50-161

すると、精製ペプチド(70.9mg)が得られた。

(1)酸による加水分解物(6N塩酸で110℃、

24時間の処理物)のアミノ酸分析:

Lys:0.87      Thr:1.00×3  
Pro:1.00×2    Ala:1.00  
Gly:0.96      Ser:0.83×2  
Phe:1.10      Cys:0.95  
Ile:1.03      Glu:1.23  
Met:1.04

(2)酵素分解物(蒸気1.75mgを0.1Mの炭酸水

素アンモニウム水溶液300mlに溶解し、ア

ミノペプチダーゼ1.2単位を加え37℃で24

時間処理した物)のアミノ酸分析:

Lys:0.77      Thr + Gln:0.92×4  
Ile:1.05      Pro:0.78×2  
Gly:0.98      Ser:0.95×2  
Phe:1.06      Cys:0.84  
Ala:1.00      Met:1.25

(3) $[\alpha]_D = -94.67^\circ$  (C=0.477, H<sub>2</sub>O)

(4)薄層クロマトグラフィ Rf=0.64

[セルロース・メルクNo 5552, n

ール-酢酸-水-ピリジン(15:

:10)エンヒドリンにより検出]

(5)高速液体クロマトグラフィ

保持時間: 6.2分

カラム: ヌープレオジール10C<sub>18</sub>(2:

溶出液: 0.1M磷酸-磷酸第二カリ

液: アセトニトリル(80:

pH 4.8

流速: 1.0ml/分

検出: UV 210 nm

(4)元素分析: C<sub>27</sub>H<sub>43</sub>N<sub>11</sub>O<sub>23</sub>S<sub>3</sub> · 10H<sub>2</sub>O

CH<sub>3</sub>COOH

計算値 C 43.27 H 7.18 N

実験値 C 44.71 H 6.27 N

#### 実施例6

実施例5で用いたのと同じ粗製原料  
(734mg:4.5μモル)を水(6ml)に5  
%酢酸を加えてpH4に調整した。酢酸  
mg)の水(2.8ml)溶液を添加し、調整す

分洗浄した。次いでこの溶液に酸化水素ガスを吹  
込み(15分間)、更に10分間窒素ガスを吹込  
んで酸化水素をバージした。セルロース粉末パ  
ッドを通して反応液の通過を行ない、母液(13.0ml)  
の一部(0.20ml)をとり、0.1M磷酸緩衝液(pH  
8.0)を加えて6mlに希釈し、更に5,5'-ジ  
チオビス(2-メトロ安息香酸):エルマンズ試  
薬の0.1M磷酸緩衝液(pH7.0)溶液を2滴加え、  
1時間放置した。412nmにおける吸光度は0.39  
であり、これはシステインのSH保護基が脱離し  
た中間体ペプチドが反応混合液中に8.42μモル  
(理論収率:84.4%)存在していることを示す。

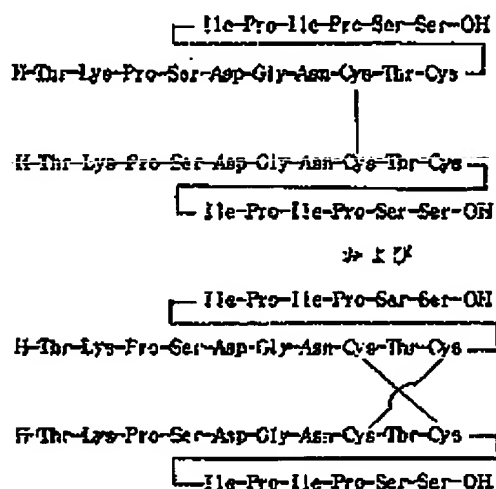
実施例1-2で得たH-Thr-Lys-Pro  
Gly-Asp-Cys(Acm)-Thr-Cys(Acm)-  
Ile-Pro-Ser-Ser-OH(200mg, 0.114  
(100ml)に溶解し、0.1Mの酢酸(2  
えてpH4に調整した。酢酸銀(80mg  
ml)溶液を加え、反応混合物を室温で  
した。次いで酸化水素ガスを15分間  
いて窒素ガスを30分間吹込んで過剰の  
バージした。反応混合物をセルロースイ  
ドによって処理し、母液と洗液を合し  
まで希釈した。これに希アンモニア水1  
8に調整した。



特開昭60-161999

H-Thr-Lys-Pro-Ser-Asp-Gly-Asn-Cys-Thr-  
Cys-Ile-Pro-Ser-Ser-OH

次いで反応混合物を室温で3日間放置し、さらに濃縮した。これをセフアデックスG-15のカラム(5.2×55cm)に吸着させ、1多酢酸で溶出した後凍結乾燥すると、粗製ペプチドが得られた。本品は次式で示す異性体の混合物である。



(1)薄層クロマトグラフィ

Rf = 0.90 と 0.12

〔セルロース板・メルクNo 5552、  
ノール酢酸-水-ピリジン(3:1  
:1)エンヒドリンにより検出〕

(2)高速液体クロマトグラフィ

保持時間: 5.2分と6.8分

カラム: スークレオジル 10C<sub>8</sub> (250×  
溶出液: 9.1多トリフルオロ酢酸-ア  
トリル(75:25)

流速: 1.0 ml/分

検出: UV 210 nm

出願人 財団法人化学及血清療法研

同 慶武薬品工業株式会社

代理人 弁理士 植 木 久